

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ASOCIADA A
RESPUESTAS DE RESISTENCIA EN AGUACATE *Persea americana* INDUCIDA
POR ESTRÉS BIÓTICO**

**LADY JOHANNA POLANIA SOLANO
JHORDAN STHING ARIAS**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

**Director
EVER ANTONI RUEDA LORZA
Doctor en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ – TOLIMA**

2015

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno asociada a respuestas de resistencia en aguacate *Persea americana* inducida por estrés biótico

AUTORES: Lady Johanna Polania Solano
Jhordan Sthing Arias

DIRECTOR: Ever Antoni Rueda Lorza

JURADOS: Yony Román Ochoa
Sinar David Granada Garcia

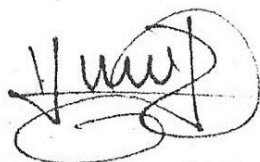
CALIFICACIÓN: 4,1

☒ X APROBADO

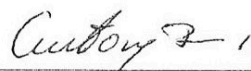
☐ REPROBADO

OBSERVACIONES: Anexo aparecen algunas observaciones del documento final bajo el cual los estudiantes podrían tener en cuenta para el trabajo terminado.

FIRMAS



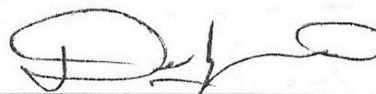
JURADO 1.



Director del trabajo



JURADO 2.



Director del programa

Ciudad y fecha: Curitiba, Brasil. 09 de septiembre de 2015.



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno asociada a respuestas de resistencia en aguacate *Persea americana* inducida por estrés biótico

AUTORES: Lady Johanna Polania Solano
Jhordan Sthing Arias

DIRECTOR: Ever Antoni Rueda Lorza

JURADOS: Yony Roman Ochoa
Sinar David Granada Garcia

CALIFICACIÓN: 4.1

☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES:

FIRMAS

JURADO 1.

Director del trabajo

JURADO 2.

Director del programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 3 Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima, por su asesoría y apoyo técnico.

A la oficina de investigaciones de la Universidad del Tolima, por la financiación de este proyecto.

Al profesor Ever Antoni Rueda Lorza por su acompañamiento y orientación.

Al profesor Jonh Jairo Méndez Arteaga por aceptarnos en el grupo de investigación y prestarnos su apoyo.

A Diego Fernando Oliveros Gómez por su asesoría y colaboración incondicional.

A Oscar Julián Muñoz por su colaboración en el proyecto.

Al CIAT y a la CIB, por facilitarnos el material biológico necesario para las pruebas realizadas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GENERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MARCO TEÓRICO	20
4.1. TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN DEL AGUACATE.....	20
4.2. VARIEDADES DE AGUACATE ESTUDIADAS	21
4.2.1. Variedad Lorena.	22
4.2.2. Variedad Hass.	22
4.3. SITUACIÓN ECONÓMICA ACTUAL DEL AGUACATE.....	23
4.3.1. Producción mundial.	23
4.3.2. Colombia y su potencial en la producción de aguacate.....	24
4.4. ENFERMEDADES.....	26
4.4.1. El género <i>Phytophthora</i> y su impacto sobre el sector agrícola.....	26
4.4.2. Pudrición de las raíces y marchitez causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	28
4.4.3. Morfología de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	29
4.4.4. Métodos de inoculación	31
4.5. MECANISMOS DE RESPUESTA Y DEFENSA EN PLANTAS	31

4.5.1. Defensa constitutiva	32
4.5.2. Resistencia inducida.....	33
4.5.2.1. Regulación de respuestas de defensa por señalización hormonal	34
4.5.2.2. Compuestos fenólicos.....	36
4.5.2.3. Síntesis de compuestos fenólicos	38
4.5.2.4. Metodologías para la cuantificación de compuestos fenólicos totales	41
4.5.2.5. Especies reactivas de oxígeno.	43
4.5.2.6. Relación de las especies reactivas de oxígeno con mecanismos de defensa	45
4.5.2.7. Peróxido de hidrógeno y su importancia en el estudio de respuestas de defensa en plantas.....	46
4.5.2.8. Métodos para la evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno	47
4.5.3. Antioxidantes.....	49
4.5.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	49
4.5.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	50
4.5.3.3. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	52
4.5.3.4. Capacidad atrapadora de radicales libres por medio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	54
5. METODOLOGÍA.....	56
5.1. MATERIALES DE AGUACATE	56
5.2. PATÓGENO	57
5.3. INDUCCIÓN BIÓTICA	57
5.4. MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS INOCULADAS	58
5.5. SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN.....	59

5.6. TOMA DE MUESTRAS.....	59
5.7. EXTRACCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES	60
5.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE LA HOJA SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	60
5.9. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN PLANTAS INOCULADAS.....	60
5.10.EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO (H₂O₂) EN HOJAS	61
5.11.EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES .	62
5.12.ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 63
6.1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS BIÓTICO SOBRE AGUACATE LORENA Y HASS.....	63
6.2. PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO	67
6.3. CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	70
6.4. CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES	75
 7. CONCLUSIONES	 79
 REFERENCIAS	 80
 ANEXOS	 107

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Origen y dispersión del aguacate	21
Figura 2 Producción de aguacate por continente durante el 2013	23
Figura 3 Valor y Volumen de las exportaciones de Colombia desde el 2008 hasta el 2014	25
Figura 4 Modelo de rutas de señalización sistémica, que pueden ser inducidas por rizobacterias, patógenos y heridas.....	36
Figura 5 Ruta del shikimato y su integración a la ruta fenilpropanoide.....	39
Figura 6 Formación de lignina y lignanos a partir de fenilalanina y tirosina.....	40
Figura 7 Reciclado del grupo amino durante el metabolismo fenilpropanoide	41
Figura 8 Reacción del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo Folin-Ciocalteu	42
Figura 9 Origen de las ERO producidas en los complejos respiratorios de la mitocondria.....	44
Figura 10 Producción de H ₂ O ₂ en los orgánulos de las células del mesófilo durante la fotosíntesis C3	45
Figura 11 Proceso de reacción oxidativa y polimerización del DAB, catalizada por la peroxidasa en presencia de H ₂ O ₂	48
Figura 12 Estabilización de especies reactivas de oxígeno por el α-tocoferol.....	51
Figura 13 Modelo de estabilización de un radical libre por un compuesto fenólico	52
Figura 14 Reacción química entre el radical DPPH y un antioxidante	54
Figura 15 Esquema general de distribución de las plantas empleadas para el desarrollo de la metodología.....	56
Figura 16 Esquema de muestreo para la cuantificación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres en aguacate Lorena y Hass	57
Figura 17 Esquema de muestreo para la evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno en aguacate Lorena y Hass.....	58

Figura 18 Invernadero artesanal para mantenimiento de las plantas de aguacate	59
Figura 19 Registro fotográfico de la sintomatología por infección de <i>P. cinnamomi</i> en aguacate Lorena.	64
Figura 20 Registro fotográfico de la sintomatología por infección de <i>P. cinnamomi</i> en aguacate Hass.	65
Figura 21 Registro de la longitud promedio de la herida causada por <i>P. cinnamomi</i> en plantas de aguacate Lorena y Hass a través del tiempo.....	66
Figura 22 Aspecto de las lesiones causadas por la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre plantas de aguacate	67
Figura 23 Producción de peróxido de hidrógeno en hojas de aguacate Hass, infectadas con <i>P. cinnamomi</i> vs tiempo después de la inoculación	67
Figura 24 Producción de peróxido de hidrógeno en hojas de aguacate Lorena, infectadas con <i>P. cinnamomi</i> vs tiempo después de la inoculación	68
Figura 25 Escala semicuantitativa para la evaluación del peróxido de hidrógeno.....	69
Figura 26 Análisis de correlación del contenido de compuestos fenólicos totales vs área de la hoja	70
Figura 27 Concentración de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate Lorena infectado con <i>P. cinnamomi</i>	72
Figura 28 Concentración de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate Hass infectado con <i>P. cinnamomi</i>	72
Figura 29 Análisis de regresión del contenido de compuestos fenólicos totales en aguacate Lorena vs Días transcurridos desde la inoculación con <i>P. cinnamomi</i>	74
Figura 30 Análisis de regresión del contenido de compuestos fenólicos totales en aguacate Hass vs Días transcurridos desde la inoculación con <i>P. cinnamomi</i>	74
Figura 31 Capacidad atrapadora de radicales libres en hojas de aguacate Lorena, infectado con <i>P. cinnamomi</i>	76
Figura 32 Capacidad atrapadora de radicales libres en hojas de aguacate Hass infectado con <i>P. cinnamomi</i>	76
Figura 33 Análisis de regresión del porcentaje de decoloración del DPPH en aguacate Lorena vs Días transcurridos desde la inoculación con <i>P. cinnamomi</i>	77

Figura 34 Análisis de regresión del porcentaje de decoloración del DPPH en aguacate Hass vs Días transcurridos desde la inoculación con <i>P. cinnamomi</i>	78
--	----